

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 63-152400

(43)Date of publication of application : 24.06.1988

(51)Int.Cl. C07K 15/22
C07K 3/22

(21)Application number : 62-169332 (71)Applicant : MORINAGA MILK IND CO LTD

(22)Date of filing : 07.07.1987 (72)Inventor : OKONOGI SHIGEO
TOMITA MAMORU
TOMIMURA TOSHIO
TAMURA YOSHITAKA
MIZOTA TERUHIKO

(30)Priority

Priority number : 61168478 Priority date : 17.07.1986 Priority country : JP

(54) PRODUCTION OF HIGH-PURITY BOVINE LACTOFERRIN

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain the titled compound on a large scale without deteriorating quality of raw material milk, by bringing the raw material milk into contact with a weak acidic cation exchanger having carboxymethyl groups which are ion exchange groups and specific hemoglobin adsorptivity to adsorb the milk, washing the weak acidic cation exchanger with water and desorbing the adsorbed aimed compound.

CONSTITUTION: Bovine lactoferrin is separated and recovered from a raw material milk containing skimmilk or whey prepared from cow's milk to produce high-purity bovine lactoferrin. In the process, the raw material milk is brought into contact with a weak acidic cation exchanger having carboxymethyl groups as ion exchange groups $\geq 3.5\text{g}/100\text{ml}$ hemoglobin adsorptivity at $0\text{W}60^\circ\text{C}$ to carry out adsorption treatment and the weak acidic cation ion exchanger is washed with water and then treated with a solution of salts to carry out adsorption treatment. Thereby the aimed high-purity lactoferrin is obtained.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

14

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11)特許出願公告番号

特公平6-13560

(24) (44)公告日 平成6年(1994)2月23日

(51)Int.Cl.⁵

C 0 7 K 15/22
3/22

識別記号

庁内整理番号

8517-4H

F I

技術表示箇所

発明の数 1 (全 10 頁)

(21)出願番号 特願昭62-169332

(22)出願日 昭和62年(1987)7月7日

(65)公開番号 特開昭63-152400

(43)公開日 昭和63年(1988)6月24日

(31)優先権主張番号 特願昭61-168478

(32)優先日 昭61(1986)7月17日

(33)優先権主張国 日本 (J P)

(71)出願人 999999999

森永乳業株式会社
東京都港区芝5丁目33番1号

(72)発明者 小此木 成夫

東京都大田区中央5-10-12

(72)発明者 富田 守

神奈川県横浜市金沢区東朝比奈1-47-6

(72)発明者 富村 俊雄

千葉県千葉市磯部5-12 コートビレジ4-103

(72)発明者 田村 吉隆

神奈川県横浜市港北区富士塚1-4-5

(72)発明者 薄田 輝彦

東京都江戸川区清新町1-4-4-101

(74)代理人 弁理士 西澤 利夫 (外2名)

審査官 塚中 哲雄

(54)【発明の名称】 高純度牛ラクトフェリンの製造法

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】牛乳から調製された脱脂乳またはホエーを含有する原料乳から牛ラクトフェリンを分離回収して高純度の牛ラクトフェリンを製造する方法において、イオン交換基としてカルボキシルメチル基を有し、且つヘモグロビン吸着能が3.5g/100ml以上である弱酸性陽イオン交換体に対し、上記原料乳を0~60℃の温度にて接触させる吸着処理と、上記弱酸性陽イオン交換体を水洗する水洗処理と、上記弱酸性陽イオン交換体を塩類溶液で処理する脱離処理とを含むことを特徴とする、高純度牛ラクトフェリンの製造法。

【請求項2】上記弱酸性陽イオン交換体の体積変化率が1.5以下であること(但し、体積変化率は、Na形における該交換体を水で膨潤させたときのベッド・ボリュームを、該交換体をイオン強度0.5の塩化ナトリウム溶

10

2

液と平衡化したときのベッドボリュームで除した値)を特徴とする特許請求の範囲第1項に記載の高純度牛ラクトフェリンの製造法。

【請求項3】ラクトフェリンが、回収された全蛋白質中80%以上の純度で得られることを特徴とする特許請求の範囲第1項または第2項記載の高純度牛ラクトフェリンの製造法。

【請求項4】上記脱離処理に用いられる塩類溶液が、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、塩化マグネシウム及びこれらの混合物からなる群から選ばれた塩類の溶液であることを特徴とする特許請求の範囲第1項~第3項の内、何れか1項記載の高純度牛ラクトフェリンの製造方法。

【請求項5】上記脱離処理が、上記群から選ばれた塩類の相対的に低濃度の水溶液で行なわれて、それによって

上記低濃度塩類溶液によって脱離する成分を除去する第1の脱離処理と、上記群から選ばれた塩類の相対的に高濃度の水溶液で行なわれて、それによって上記高濃度の塩類溶液によって脱離する成分を回収する第2の脱離処理とを含むことを特徴とする、特許請求の範囲第4項記載の高純度牛ラクトフェリンの製造法。

【請求項6】上記相対的に低濃度の水溶液の濃度が0.4～2.5重量%であり、上記相対的に高濃度の水溶液の濃度が1.5～12であることを特徴とする特許請求の範囲第5項記載の高純度牛ラクトフェリンの製造法。

【請求項7】ラクトフェリンが、回収された全蛋白質中98%の純度で得られることを特徴とする特許請求の範囲第5項又は第6項記載の高純度牛ラクトフェリンの製造法。

【発明の詳細な説明】

〔産業上の利用分野〕

本発明は高純度牛ラクトフェリンの製造法に関する。

〔技術的背景及び従来技術〕

ラクトフェリンは乳汁、唾液等の外分泌液中に存在する鉄結合性の蛋白質であり、乳児や子牛の授乳において鉄を運搬する蛋白質として栄養学的に重要な働きを担っていること、及びその鉄結合性の特性ゆえに鉄要求性の高い病原性細菌に対して強い静菌作用を有することが知られている。即ちラクトフェリンは、乳中に存在する免疫グロブリンやリゾチーム等と共に、栄養学的見地のみならず感染予防の見地からも重要な乳蛋白質である。ラクトフェリンの乳中における存在形態は鉄の結合の有無によって2種のものが知られている。また、ラクトフェリンは初乳には比較的多く含有されているものの、常乳中の含有は少なく、例えば牛乳1中のラクトフェリンは約250mgと微量含まれているに過ぎない。

このようにラクトフェリンは有益な生理作用を有しているにもかかわらず、乳中の含量が少ないため、その工業的な分離・精製は困難とされてきた。

しかしながら一方では、この有益なラクトフェリンを乳から分離精製しようとする種々の試みが従来から行なわれている。

たとえば、牛乳から脂肪を分離した脱脂乳において、カゼインをpH4.6で等電点沈澱させたカゼイン画分或はホエー画分を硫酸アンモニウムで分画し、数種のイオン交換体でカラム分画して精製する方法 (M.L.Groves, J.Am.Chem.Soc., 82巻, 3345～3350頁, 1960年; M.L.Groves, Biochem.Biophys.Acta., 100巻, 154～162頁, 1965年) 、

ラクトパーオキシターゼを精製する方法において、レンネットホエーをpH7.0に調製し、弱酸性陽イオン交換樹脂に接触させて吸着させ、樹脂を分取した後、脱離液で脱離させ、硫酸アンモニウムで分画し、次いで弱酸性陽イオン交換樹脂或は燐酸カルシウムのカラム分画を行った際に、不純物として混合されているラクトフェリンが

副次的に分画される方法 (M.Morrison et al, J.Biol.Chem., 228巻, 767～776頁, 1957年; W.G.Gordon et al, Biochem.Biophys.Acta., 60巻, 410～411頁, 1962年) 、母乳を硫酸アンモニウムで分画し、その上澄画分に硫酸アンモニウム鉄を添加し、次いで弱酸性陽イオン交換体に接触させてカラム分画し、精製する方法 (P.Querinjean et al, Eur.J.Biochem., 20巻, 420～425頁, 1971年) 、

また硫酸アンモニウム鉄を含有する水にて母乳を3倍に希釈し、弱酸性陽イオン交換体に接触させてカラム分画し、精製する方法 (B.G.Johansson, Acta.Chem.Scand., 23巻, 683～684頁, 1969年) 等のラクトフェリン分離製法が報告されている。

また、モノクロナール抗牛ラクトフェリン抗体を固定して利用するアフィニティークロマトグラフィー法も知られている (特開昭61-145200号公報) 。

〔発明が解決しようとする問題点〕

しかしながら、上記した従来のラクトフェリン分離精製法は、効率が悪いので、工業的規模でラクトフェリンを大量に製造するには不適當である。

また、これら従来法では、その工程中において何等かの物質を原料乳中に添加するので、大量の原料乳の品質を必然的に変化させてしまうと言う欠点を持っていた。例えば、分画のための硫酸アンモニウムの添加、硫酸ラクトフェリンの存在形態を鉄結合型に変えるための鉄含有溶液の添加、pH値の調製のための酸、アルカリ液の添加などである。更に、ラクトフェリンを精製する上においても、数種のイオン交換体を用いたり、カラムの脱離条件を種々変化させたり、硫酸アンモニウム分画を用いたりすることによって、ラクトフェリン以外の物質を除去して、大量の原料液の品質を変化させ、あるいは複雑な工程を必要とさせていた。

また、アフィニティークロマトグラフィー法を工業的に利用するためには抗体を大量に生産することが必要とされるためコスト高となること、及び抗体の安定性が非常に限られていることから、その工業的な実施は、事実上きわめて困難であった。

〔発明の目的及び発明の要約〕

本発明の目的は、従って、ラクトフェリンの乳からの分離精製に関する上記従来技術の欠点を改善した新規な牛ラクトフェリンの製造法を提供することにある。即ち、原料乳の組成・品質に大きな変化を与えることなく、また複雑な工程を用いることなく、ラクトフェリン (以下単なるラクトフェリンとの記載は、牛ラクトフェリンをいう。) を分離精製することのできる工業的製造法を提供することにある。

本発明の方法は、基本的な3工程を含んでいる。即ち、イオン交換基としてカルボキシメチル基を有し、且つヘモグロビン吸着能が3.5g/100ml以上である弱酸性陽イオン交換体と原料乳とを接触させて、ラクトフェ

10

20

30

40

50

リンを選択的に吸着させる吸着処理、上記イオン交換体を水で洗浄して、上記イオン交換体に吸着されていない物質を除去する水洗処理、及び1種類以上の塩類溶液で上記イオン交換体から吸着された物質を脱離させる脱離処理である。

本発明は、原料乳に何等の物質も添加することなく、直接にイオン交換体で処理するので、大量の原料乳の品質を変化させることがない。また、イオン交換体を選択することにより、ラクトフェリンを選択的に吸着させるので、高純度でラクトフェリンを分離回収することができる。

上記の基本的方法において、脱離処理を2段階で行うことができる。第1の脱離処理においては、上記水洗処理の後に、相対的に低濃度の1種類以上の塩類溶液を用いて、上記イオン交換体を処理して、吸着された物質の内、低濃度溶液で脱離され得る不純物を除去する。この第1の脱離処理を行う場合には、第2の脱離処理は相対的に高濃度の塩類溶液を用いて行う。

本発明の基本的方法によれば、回収された蛋白質中、80重量%以上の高純度でラクトフェリンが得られる。また、脱離処理を2段階で行うことにより、回収された全蛋白質中、98重量%以上の高純度の牛ラクトフェリンが得られる。

本発明において用いられるイオン交換体は、イオン交換基としてカルボキシメチル基を有し、且つヘモグロビン吸着能が3.5g/100ml以上の弱酸性陽イオン交換体を用いることが重要である。尚、上記ヘモグロビン吸着能の基準については、後に詳述する。

また、体積変化率が1.5以下のいわゆるハードタイプの弱酸性陽イオン交換体を用いるのが望ましく、本発明方法がカラムを用いて連続的に行なわれる場合には、特に望ましい。本明細書において用いられている体積変化率の基準は、Na形におけるイオン交換体を水で膨潤させたときのベッドボリュームを、該交換体をイオン強度0.5の塩化ナトリウム溶液と平衡化したときのベッドボリュームで除した値である。

また、吸着処理は、0～60℃の温度で行なわれるのが望ましい。

脱離液としては、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、塩化マグネシウム、またはそれらの混合物よりなる群から選択された塩の溶液を用いることができる。

上記の脱離処理を2段階で行う場合には、上記相対的に低濃度の溶液は、0.4～2.5%（重量、以下同じ）の範囲から選択し、上記相対的に高濃度の溶液は、1.5～12%の範囲から選択される。

〔本発明の具体的な説明〕

以下に本発明の技術構成について詳述する。

本発明は、とりわけ高純度の牛ラクトフェリンを工業的に製造するのに適している。

この目的から、本発明においては、ラクトフェリンが存在している牛乳由来の脱脂乳又はホエーを原料として用いる。なお、ホエーは甘性ホエー、酸ホエーのいずれであってもよい。以下、これらの材料を単に「原料乳」と言う。望ましくは、原料乳は加熱によって殺菌されていないものを用いる。その理由は牛ラクトフェリンは高温殺菌により大きく変性する傾向が見られるからである。ラクトフェリンはその等電点が7.8であるといわれており、従ってこれにより低いpH域の原料乳においては（+）帯電している。即ち、pH6.7の脱脂乳、pH6.4の甘性ホエー及びpH4.6の酸ホエーのいずれにおいても、ラクトフェリンは（+）帯電している。その（+）帯電の傾向は、原料乳のpHが低い程、強い帯電性を示す。一方、原料乳中の他の多くの蛋白質の等電点はラクトフェリンよりも低く、5前後である。従って、脱脂乳や甘性ホエーのpHにおいては、これらの蛋白質は（-）帯電しており、酸ホエーのpHにおいては等電点付近にあるか又は弱い（+）帯電をしている。

本発明は、これらの蛋白質の帯電性の違いを利用してラクトフェリンの分離を行おうとするものである。即ち、原料乳に含まれる蛋白質中のラクトフェリンとその蛋白質の帯電性の正負或は帯電性の強弱を利用して、原料乳から（+）に帯電したラクトフェリンを選択的にイオン交換体に吸着させる。従って、本発明においては、陽イオン交換体を用いることが必須である。

また、ラクトフェリンは分子量約8万の大きな蛋白質である。本発明方法を工業的に行う場合には、ポーラスな陽イオン交換体を用いて、ラクトフェリン分子がポーラス構造内に自由に入り得るようにし、大量に吸着されるようにすることが必要である。

本発明においては、上記の交換体の多孔性又は吸着性は、ラクトフェリンに匹敵する大きい分子量を有する典型的な蛋白質であるヘモグロビン吸着能を指標とすることができる。このヘモグロビン吸着能は下記に説明する方法によって求められた。

即ち、pH5.0に調整した0.05Mクエン酸-クエン酸ナトリウムの緩衝液に、ヘモグロビン400mgを溶解して100mlのヘモグロビン溶液を調整した。水にて膨潤したナトリウム形のイオン交換体2mlを同緩衝液にて平衡化した後、該溶液中に投入した。25℃にて2時間攪拌した後、該イオン交換体分取、同緩衝液にて洗浄して未吸着のヘモグロビンを回収し、上記回収液中のヘモグロビン及び上記ヘモグロビン溶液中に残存するヘモグロビン量を測定して吸着量を求めた。本明細書では、この値を、水にて膨潤したナトリウム形のイオン交換体100ml当たりのヘモグロビン吸着量(g)として用いている。

以下に、若干の試験例を説明して、本発明の有効性を例証する。

試験1

この試験の目的は、本発明で用いられるのに適した交換体を例証することである。

表1に記載した10種の市販の陽イオン交換体について、次の要領にてパッチ処理し、ラクトフェリン分離回収性を試験した。

ナトリウム形のイオン交換体を水で膨潤させて10mlとしたものを生の脱脂牛乳1kg (pH6.7) に投入した。この混合液を、4℃で16時間攪拌した後、該イオン交換体を分取して水洗した。ついで10%食塩水150mlでラクトフェリンをイオン交換体から脱離し、この回収液中のラクトフェリン含量をラウレル (Laurell) 法 (C-B, Laurell, Anal. Biochem., 15巻, 45頁, 1966年) により測定した。その測定結果は表1に併せて示す通りである。

また、イオン交換体による吸着処理後の脱脂乳のpHも併表

せて表1に示した。

更に、回収液に含まれる蛋白質に占めるラクトフェリン含有比率(%)を、回収液の280nmにおける総蛋白質の吸光度に占めるラクトフェリンの吸光度比率(ラクトフェリン1%液の280nmにおける吸光度を12.7として計算)から近似的に求められる。この値を、ラクトフェリンの純度として表1に示した。

なお、上記280nmにおける吸光度を用いて蛋白質濃度を測定する手法は広く行なわれている。

事実、本発明の回収液においては、それに含有される全蛋白質に対するラクトフェリンの含有率が高いので、上記280nmにおける吸光度比率(%)から近似的に求めた値は、他の精密な測定方法によって求めた値と殆ど等しかった。(例えば後記実施例2参照)。

1

実験No.	1	2	3	4	5
樹脂名(商品名) (メーカー名) イオン交換基	アンバーライト120B (オルガノ) スルフォン酸	ダイヤイオンWK-11 (三菱化成) メタクリル酸	ダイヤイオンWK-10 (三菱化成) メタクリル酸	P-セルロース (セルバ) リン酸	CM-セファディックスC-25 (ファルマシア) カルボキシメチル
総イオン交換容量 [meq/100ml]	190	320	270	12	52
ヘモグロビン吸着能力 [g/100ml]	1.8	2.6	2.5	3.4	2.3
ラクトフェリン回収量 [mg]	<2	14	38	<2	4
ラクトフェリンの純度 [重量%]	—	36	35	—	25
イオン交換体処理後脱脂乳pH	6.8	6.8	6.8	6.7	6.7

実験No.	6	7	8	9	10
樹脂名(商品名) (メーカー名) イオン交換基	CM-セルロース (ブラウン) カルボキシメチル	CM-トヨパール650M (東洋ソーダ) カルボキシメチル	CM-セファロースFF (ファルマシア) カルボキシメチル	セパビーズFP-CM13 (三菱化成) カルボキシメチル	CM-セファディックスC-50 (ファルマシア) カルボキシメチル
総イオン交換容量 [meq/100ml]	8	10	12	14	10
ヘモグロビン吸着能力 [g/100ml]	2.3	4.7	6.1	4.5	3.9
ラクトフェリン回収量 [mg]	6	58	57	85	91
ラクトフェリンの純度 [重量%]	24	92	95	97	96
イオン交換体処理後脱脂乳pH	6.7	6.7	6.7	6.7	6.7

表1の結果から明らかなように、イオン交換基としてカルボキシメチル基を有し、かつヘモグロビン吸着能力が

3.5g/100ml以上である弱酸性陽イオン交換体を用いた実験No. 7~10においては、いずれも、ラクト

フェリン回収量が大きく、またラクトフェリンの純度も90%以上であって高純度のラクトフェリンが得られた。これに対し、カルボキシメチル基以外のイオン交換基を有する弱酸性陽イオン交換体(実験No. 1~4)ではいずれもラクトフェリン回収量が極めて小さいか、或は少量回収されてもラクトフェリン純度の低いものであった。また、イオン交換基としてカルボキシメチル基を有するものであっても、ヘモグロビン吸着能力が3.5g/100mlに満たない場合(実験No. 5~6)には、ラクトフェリン回収量もその純度も低いものであった。これらの試験結果により、本発明に用いるべき弱酸性陽イオン交換体は、上記2つの条件、即ちイオン交換基としてカルボキシメチル基を有すること、ヘモグロビン吸着能力が3.5g/100ml以上出ること、を共に満足するものでなければならないことが判明した。

また、実験No. 7~10においては、ラクトフェリンを吸着処理した後の脱脂乳のpHは殆ど変化せず、また風味的にも認められなかった。

従って、本発明方法は原料乳の品質を損なうことなく、ラクトフェリンを高純度で製造できることが判明した。

試験2

この試験の目的は、本発明において用いられる弱酸性陽イオン交換体に対して適用し得る対イオンを例証すること

表

実験No.(対イオン形)	11(H)	12(Na)	13(K)	14(Ca)	15(Mg)
対イオン交換体置換用溶液	0.8% HCl	10% NaCl	12.4% KCl	12.2% CaCl ₂ ・2H ₂ O	16.2% MgCl ₂ ・6H ₂ O
ラクトフェリン回収量 [mg]	123	111	98	108	102
ラクトフェリンの純度[重量%]	89	87	87	92	91
イオン交換体処理後の脱脂乳pH	6.6	6.7	6.7	6.7	6.7

試験3

この試験の目的は、本発明の基本方法における脱離処理を2段階で行うことの有利性を例証することである。

イオン交換基としてカルボキシメチル基を有し、ヘモグロビン吸着能力が3.9g/100mlであるCM-セファデックスC-50(ファルマシア製)0.4gを水で膨潤し、18mlのNa型のイオン交換体に変換し、これをpH6.7の生の牛脱脂乳2.0kgに投入し、4℃で攪拌・接触させた。16時間後、布にてイオン交換体を回収し、カラムに充填し、水洗して脱脂乳分を除いた後、図1のグラフの横軸に示す各濃度の塩化ナトリウム溶液50mlを低濃度から順次通液し、各流出液を分画し200mlにおける吸光度及びラクトフェリン濃度を測定し、その結果を同図に示した。

同図の280nm吸光度変化から、イオン交換体の蛋白質の脱離は、通液した流出液の食塩濃度の上昇に伴い2つの画分として分画されることが判る。低濃度の塩化ナトリウム溶液で脱離される第1の画分は、主としてラクト

とである。

上記試験1において、本発明で使用し得ることが判明した、CM-セロファースFF(ファルマシア製)30mlに、表2記載の対イオン置換用溶液各500gを通じた後、水洗して各対イオンを有するイオン交換体を調製した。次いで、これらイオン交換体を脱脂乳1kgに投入して4℃で16時間接触、攪拌し、バッチ処理した後、脱脂を分取して水洗し、後10%食塩水300mlでラクトフェリンを脱離した。この回収液中のラクトフェリン回収量、ラクトフェリンの純度及びイオン交換体処理後の脱脂乳pHを測定した結果は、表2に示す通りである。

表2の結果から明らかなように、対イオンの形がH、Na、K、Ca、Mgのいずれの形であっても、ラクトフェリンの回収率は大きく、また回収液の蛋白質に占めるラクトフェリン純度も80%以上であって高純度のラクトフェリンが得られた。またラクトフェリンを吸着処理した後の脱脂乳pHには殆ど変化が見られず、また風味的にも変化が認められなかった。

従って、本発明に用いる弱酸性陽イオン交換体の対イオンの形は特に問題とはならず、H、Na、K、Ca、Mg等のいずれの形であってもよいことが判明した。

以上の試験結果から、本発明の基本的方法によって、高純度のラクトフェリンが製造できることが例証された。

2

フェリン以外の成分であり、高濃度の塩化ナトリウム溶液で脱離される第2の画分は、ラクトフェリンが主たる成分である。そしてこの2つの画分の境界となる塩化ナトリウム溶液の濃度は1.4~1.6%であることが知れる。

試験3の結果から、脱離工程において、先ずラクトフェリン以外の蛋白質を低濃度の塩化ナトリウム溶液で脱離・分離し、次いで吸着されているラクトフェリンを高濃度の塩化ナトリウム溶液で回収すれば、高純度のラクトフェリンを得ることが示唆される。

試験4

この試験の目的は、上述の示唆が正しいことを例証することである。

試験3と同様に膨潤させたCM-セファデックス0.4gを生の牛脱脂乳2.0kgに投入し、4℃で16時間攪拌・接触させ、バッチ処理し、布にてイオン交換体を回収してカラムに充填し、水洗して脱脂乳分を除いた後1000mlの1.6%塩化ナトリウム溶液をカラムに通液

し、イオン交換体に吸着した第1の画分を脱離・分離させた。その後100mlの5%塩化ナトリウム溶液をカラムに通液して回収液100mlを得た。回収液のラクトフェリン濃度は、176mg/100mlであり、280nmにおける吸光度は2.25であった。従って、回収液中にラクトフェリンが176mg得られ、その純度は、99%
($176 \times 0.0127 \times 100 / 2.25$)であった。

この結果から、比較的低濃度の塩類で、ラクトフェリン以外の蛋白質を予め脱離・除去し、ついで比較的高濃度の塩類溶液で脱離処理することにより、更に高純度のラクトフェリンが製造できることが確認された。

以上の試験1~4から、本発明方法により高純度のラクトフェリンが製造できることが判明した。

2段階の脱離処理は、ラクトフェリンの純度向上(98%以上)に有効であることもまた判明した。

また、以上の試験から、低濃度及び高濃度の塩類溶液は、共に上記の塩化ナトリウム以外に塩化カリウム、塩化カルシウム、塩化マグネシウム及びこれらの任意の混合物の内から選ばれた物質を用いて実施することができるとも明らかである。また、低濃度及び高濃度の塩類は互いに異なる種類の塩類を使用できる。そしてこれら物質の低濃度及び高濃度の範囲としては、塩類により若干異なるが、それぞれおよそ0.4~2.5%及び1.5~12%である。

本発明における原料乳とイオン交換体との接触、即ち吸着処理は、使用するイオン交換体の後述する通液特性を考慮したうえでバッチ攪拌法、カラム連続法等の適宜の方法で行うことができ、原料乳とイオン交換体を十分に接触させることのできる方法であればいずれも実施可能である。

原料乳とイオン交換体の混合体積比率は、イオン交換体の吸着能力に応じ、またバッチ法においては目的に応じて任意に、調製することができる。即ち、バッチ法においては、一定量の原料乳から多くの収量を望む場合には多くのイオン交換体を用い、また一定量のイオン交換体で多くの収量を望む場合には多くの原料乳を用いることが適当である。

原料乳とイオン交換体の接触時の温度は、60℃を越える高温ではラクトフェリンが次第に変性する傾向を持つため、0~60℃とすることが必要である。また、未殺菌の原料乳にあつては、細菌の繁殖を防ぐため、0~10℃で実施することが望ましい。

原料乳とイオン交換体の接触時間については、接触時の温度、採用する接触方式(バッチ法又はカラム連続法)等を勘案して適宜条件を選択する。

この接触方式の採用にあたっては、イオン交換体の通液特性の1つを規定するタイプの相違を考慮することが望ましい。

即ち、弱酸性陽イオン交換体は、特性上2つのタイプがある。いわゆるハードタイプ及びソフトタイプと呼ばれ

るものである。ハードタイプのイオン交換体は、イオン強度又はpHによってベッドボリュームはほとんど変化せず、また処理後の流速を上げるなどによりイオン交換体に圧力を加えても樹脂の圧密化はほとんどなく、イオン交換体をカラム内に保持して高速流で通液することが可能である。即ち、ハードタイプのものはバッチ法にも使用し得るが、特にカラム連続法に適する。一方、ソフトタイプのイオン交換体はイオン強度又はpHによってベッドボリュームは大きく変化し、また処理液の流速を上げるなどにより、イオン交換体に圧力を加えると樹脂は容易に圧密化し、イオン交換体をカラム内に保持して高速流で通液することは困難であり、特に脱脂乳やホエー通液時は他の塩類溶液通液時に比べてイオン交換体層内で大きな圧力損失を示す。従って、原料乳とイオン交換体の接触方式としてソフトタイプのイオン交換体はカラム連続法には不適當であり、専らバッチ法に適する。

そして、ハードタイプ及びソフトタイプの性質を表す指標として、イオン強度の変化に基づくイオン交換体のベッドボリューム変化を用いることができ、本発明ではNa形の弱酸性陽イオン交換体を水で膨潤させたときのベッドボリュームを、該弱酸性陽イオン交換体がイオン強度0.5の塩化ナトリウム溶液と平衡化したときのベッドボリュームで除した値(以下体積変化率という)を用いる。

またNa型のイオン交換体は、単に水で完全に湿潤させればよく、Na型でないイオン交換体の場合には、10%塩化ナトリウム溶液を通液してNa型とした後、洗液中に塩素イオンが検出されなくなるまで水洗すればよい。

例えば、表1に掲げたイオン交換体のうちハードタイプのものはCM-トヨパール650、CM-セロファースFF、セバピーズFP-CM13であり、体積変化はすべて1.0であった。またソフトタイプのものはCM-セデックスC-50であり、その体積変化は3.0であった。

また本発明では、ハードタイプ及びソフトタイプいずれのものであっても、ラクトフェリンを選択的に吸着するイオン交換体を用いるため、本発明では脱離工程は単一の操作で実施でき、更に高純度のラクトフェリンを得る場合においても、2回の操作で実施することができる。そして、本発明では回収液中の塩類と水の除去は常法に従って行うことができる。即ち、限外過法、電気透析法或は他の透析法により所望の程度まで塩類を除去した後、凍結乾燥或は噴霧乾燥等により水を除去することによって行なわれる。

以下に本発明の若干の実施例を説明する。

実施例1

イオン交換基としてカルボキシメチル基を有し、ヘモグロビン吸着能力が4.6g/100ml、体積変化が1.0であるCM-トヨパール650(東洋ソーダ製)500mlを内径10cmのカラムに充填し、10%食塩水2を通じた後水洗して、Na型のイオン交換体を調製した。続いてpH

6. 7の生の牛脱脂乳60を温度4℃、4/hの流速でカラム通液した。カラム通過後の脱脂乳はpH6. 7であって変化はなく、外観、風味等にも変化は認められなかった。脱脂乳通過後、カラムに水を通じて水洗いし、脱脂乳分を除いた後、10%食塩水5を5/hの流速で通液してイオン交換体吸着成分を脱離し、回収液5. 0を得た。この間ベッドボリュームの変化は認められなかった。

回収液のラクトフェリン濃度は36ml/100mlであり、280nmにおける吸光度は0. 497であった。従って回収液中にラクトフェリンが1800mg得られ、そのラクトフェリンの純度は92% (36×0. 0127×100/0. 497) であった。

実施例2

イオン交換基としてカルボキシメチル基を有し、ヘモグロビン吸着能力が、6. 1g/100ml、体積変化が1. 0であるCM-セファロースFF (ファルマシア製) 1をカラムに充填し、2の0. 1N HClを通液した後水洗して、H形のイオン交換体を調製した。次いで該イオン交換体を取り出し、pH6. 7の生の牛脱脂乳100に投入し、4℃で6時間攪拌、接触させバッチ処理した。6時間経過後、過布にてイオン交換体を除去した。イオン交換体除去後の脱脂乳はpH6. 7であって全く変化はなく、また外観、風味等の変化も認められなかった。

取り出したイオン交換体はカラムに充填し、水を通じて牛脱脂乳分を除いた後、10%食塩水5を5/hの流速で通液してイオン交換体吸着成分を脱離し、回収液5. 0を得た。なおこの工程中のベッドボリュームの変化はほとんどみとめられなかった。回収液のラクトフェリン濃度は110mg/100mlであり、280nmにおける吸光度は1. 47であった。従って回収液中にラクトフェリン5500mgが得られ、そのラクトフェリンの純度は95% (110×0. 0127×100/1. 47) であった。次いで、この回収液4. 9を分画分子量20, 000を有するDDS社製限外過膜GR61PPを装着したラボモジュールを用いて循環流量8/min., 平均圧力3kg/cm²で限外過し、次いで水を加えてダイアフィルトレーションを行って食塩除去を実施した後、食塩除去濃縮液を凍結乾燥し、凍結乾燥品4. 1gを得た。この凍結乾燥品を精密に分析したところ、水分3. 2%, ラクトフェリン92%, 及び灰分0. 3%の組成を有していた。この凍結乾燥品の蛋白質の占めるラクトフェリンの重比率は、95% (92×100/(100-3. 2-0. 3)) であり、回収液の吸光度比率から求めたラクトフェリンの純度と等しいことが判った。

実施例3

脂肪含有量3. 0%に調製した牛の乳を75℃にて15秒間殺菌し、後30℃に冷却し、殺菌乳100kgを得た。これに50mlの水に溶解された5gの塩化カルシウ

ムを添加し、1のスターター (ストレプトコッカスラクティス; *Streptococcus lactis*を使用) を添加した後、500mlの水に溶解されたレンネット2gを添加した。凝固後、カッティング、クッキングを行いホエーを排出した。得られたホエーを浄化後、75℃、15秒の殺菌を行い、殺菌チーズホエーを製造した。得られた殺菌チーズホエーはpH6. 4、ラクトフェリン濃度19mg/100mlであった。

イオン交換基としてカルボキシメチル基を有し、ヘモグロビン吸着能力が、3. 9g/100ml、体積変化が3. 0であるCM-セファデックスC-50 (ファルマシア製) 2. 5gを水に膨潤し、Na形のイオン交換体とし、これを上記殺菌チーズホエー50kgに投入し、4℃にて16時間接触、攪拌し、バッチ処理した。16時間経過後、過布にてイオン交換体を除去した。イオン交換体を除去した後の殺菌チーズホエーのpHは6. 4であって変化はなく、また外観、風味等の変化も認められなかった。

取り出したイオン交換体はカラムに充填し、水を通じてホエー分を除いた後、0. 05Mクエン酸-クエン酸ナトリウムでpH8. 0に調製した0. 5N塩化カリウム溶液500mlを500ml/hの流速で通液してイオン交換体吸着成分を脱離し、回収液550mlを得た。回収液のラクトフェリン濃度は235mg/100mlであり、280nmにおける吸光度は3. 19であった。従って回収液中にラクトフェリン1290mgが得られ、そのラクトフェリンの純度は94% (235×0. 0127×100/3. 19) であった。

実施例4

脂肪含有量3. 0%に調製した牛の乳を75℃にて15秒間殺菌し、後30℃に冷却し、殺菌乳100kgを得た。これに50mlの水に溶解された5gの塩化カルシウムを添加し、1のスターター (ストレプトコッカスラクティス; *Streptococcus lactis*を使用) を添加した後、500mlの水に溶解されたレンネット2gを添加した。凝固後、カッティング、クッキングを行いホエーを排出した。得られたホエーを浄化後、75℃、15秒の殺菌を行い、殺菌チーズホエーを製造した。得られた殺菌チーズホエーはpH6. 4、ラクトフェリン濃度19mg/100mlであった。

イオン交換基としてカルボキシメチル基を有し、ヘモグロビン吸着能力が3. 9g/100ml、及び体積変化が3. 0であるCM-セファデックスC-50 (ファルマシア製) 2. 5gを水に膨潤し、113mlのベッドボリュームを有するNa形のイオン交換体とし、これを上記殺菌チーズホエー50kgに投入し、4℃にて16時間接触、攪拌し、バッチ処理した。16時間経過後、過布にてイオン交換体を除去した。イオン交換体を除去した後の殺菌チーズホエーのpHは6. 4であって変化はなく、また外観、風味等の変化も認められなかった。

10

20

30

40

50

取り出したイオン交換体はカラムに充填し、水を通じてホエー分を除いた。この時のベッドボリュームは87mlであり、体積変化率は1.3 (113/87)であった。その後塩化ナトリウム10%溶液500mlを250ml/hの流速で通液してイオン交換体吸着成分を脱離し、回収液550mlを得た。この時のベッドボリュームは24mlであり、体積変化率は4.7 (113/24)であった。回収液のラクトフェリン濃度は224mg/100mlであり、280nmにおける吸光度は3.05であった。従って回収液中にラクトフェリンが1230mg得られ、そのラクトフェリンの純度は93% ($224 \times 0.0127 \times 100 / 3.05$)であった。

実施例5

生の牛脱脂乳を35℃に加温し、よく攪拌しながら9倍に希釈した塩酸を滴下してpH4.6に調整し、凝集したカードを分離解除して酸ホエーを製造した。得られた酸ホエーはpH4.6でラクトフェリン濃度は26mg/100mlであった。

カルボキシメチル基のイオン交換基を有し、ヘモグロビン吸着能力が、4.5g/100ml、及び体積変化率が1.0であるセバピーズFP-CM13 (三菱化成製) 100mlをカラムに充填し、0.1N HCl 200mlを通液した後、水洗し、H形のイオン交換体を調製した。次いで該イオン交換体を取り出し、上記酸ホエー10に投入し、4℃で16時間攪拌、接触させバッチ処理した。16時間後、イオン交換体を取り出しカラムに充填した。イオン交換体を除去後の酸ホエーはpH4.7であってpH変化は極く僅かであって、また外観、風味等の変化は全く認められなかった。

充填したイオン交換体は水を通じてホエー分を除いた後、10%食塩水500mlを500ml/hの流速でカラム通液して回収液500mlを得た。これまでの工程中でベッドボリュームの変化はみとめられなかった。回収液のラクトフェリン濃度は280mg/100mlであり、280nmにおける吸光度は3.78であった。従って回収液中にラクトフェリン1400mgが得られ、そのラクトフェリンの純度は94% ($280 \times 0.0127 \times 100 / 3.78$)であった。

実施例6

イオン交換基としてカルボキシメチル基を有し、ヘモグロビン吸着能力が3.9g/100ml、体積変化率が3.0であるCM-セファデックスC-50 (ファルマシア製) 25gを水にて膨潤させ、Na形の1130mlのイオン交換体を得た。これを、55℃に加温したpH6.7の生の牛脱脂乳100kgに投入し、同温度にて1時間接触・攪拌した。1時間経過後、過布にてイオン交換体を除去した。イオン交換体を除去した脱脂乳のpHは6.7であって変化はなく、また外観、風味等の変化は何等認められなかった。

取り出したイオン交換体はカラムに充填し、水を通じて

脱脂乳分を除いた。この時のベッドボリュームは800mlであり、体積変化率は1.4 (1130/800)であった。その後5%食塩水7を7/hの流速でカラム通液してイオン交換体吸着成分を脱離し、回収液7.6を得た。この時のベッドボリュームは340mlであり、体積変化率は3.3 (1130/340)であった。回収液のラクトフェリン濃度は130mg/100mlであり、280nmにおける吸光度は1.97であった。従って回収液中にラクトフェリンが9.9g得られ、そのラクトフェリンの純度は84% ($130 \times 0.0127 \times 100 / 1.97$)であった。

実施例7

カルボキシメチル基のイオン交換基を有し、ヘモグロビン吸着能力が、4.5g/100ml、及び体積変化率が1.0であるセバピーズFP-CM13 (三菱化成製) 100mlを内径10cmのカラムに充填し、12%塩化カリウム溶液2を通液した後、水洗し、K型のイオン交換体を調製した。続いてpH6.7の生の牛脱脂乳96kgを温度4℃、6/hの流速でカラム通液した。カラム通過後の脱脂乳はpH6.7であって変化なく、また外観、風味等にも変化は何等認められなかった。脱脂乳通液後、カラムに水を通じて水洗し、脱脂乳分を除いた後、2.5%塩化カリウム溶液20を通じて洗浄不純物を分離した、次いで12%塩化カリウム10を通じてイオン交換体吸着成分を脱離し、回収液10.0を得た。なおこれらの工程における体積変化はみとめられなかった。

回収液のラクトフェリン濃度は62mg/100mlであり、280nmにおける吸光度は0.79であった。従って回収液中にラクトフェリン6.2gが得られ、そのラクトフェリンの純度は99.7% ($62 \times 0.0127 \times 100 / 0.79$)であった。

実施例8

カルボキシメチル基のイオン交換基を有し、ヘモグロビン吸着能力が3.9g/100mlおよび体積変化率が3.0であるCM-セファデックスC-50 (ファルマシア製) 2.5gを水に膨潤し、Na形の113mlのイオン交換体とし、これをpH6.7の生脱脂乳10に投入し、4℃にて接触・攪拌しバッチ処理した。16時間後、過布にてイオン交換体を分離・除去した。イオン交換体除去した後の脱脂乳のpHは6.7であって変化なく、またこの時点でのベッドボリュームは82mlであり、体積変化率は1.4 (113/82)であった。次いで1.6%塩化ナトリウム溶液2.0を通じて洗浄不純物を分離した後、5.0%塩化ナトリウム溶液1.0を通じてイオン交換体吸着成分を脱離し、回収液1.1を得た。この時点でのベッドボリュームは35mlであり、体積変化率は3.2 (113/35)であった。

回収液のラクトフェリン濃度は61mg/100mlであり、280nmにおける吸光度は0.78であった。従って回収液中にラクトフェリンが670mg得られ、そのラ

10

20

30

40

50

クトフェリンの純度は99.3% ($61 \times 0.0127 \times 100 / 0.78$) であった。

次いで、回収液を透析チューブに入れてイオン交換水にて透析し、塩化ナトリウム除去を実施した後、凍結乾燥し、凍結乾燥品を650mg得た。凍結乾燥品は水分2.9%、ラクトフェリン96.2%、及び灰分0.5%の組成を有していた。この凍結乾燥品の蛋白質に占めるラクトフェリンの重量比率は99.6% ($96.2 \times 100 / (100 - 2.9 - 0.5)$) であり、回収液の吸光度比率から求めたラクトフェリンの純度とほぼ等しいことが分かった。

実施例9

イオン交換基としてカルボキシメチル基を有し、ヘモグロビン吸着能力が、4.6g/100ml及び体積変化が1.0であるCM-トヨパール650C500mlをカラムに充填し2.0%塩化マグネシウム水溶液5を通液した後、水洗し、Mg型のイオン交換体を調整した。次いで該イオン交換体を取り出し、pH6.7の生の牛脱脂乳50に投入し、55℃で1時間攪拌、接触させバッチ処理した。過布にてイオン交換体を除去した。イオン交換体除去後の脱脂乳のpHは6.7であって全く変化はなく、また外観、風味等の変化も認められなかった。取り出したイオン交換体はカラムに充填し、水を通じて脱脂乳分を除いた後、0.55%塩化マグネシウム溶液10を通じて洗浄し不純物を分離した後、2.0%塩化マグネシウム水溶液5.0を通液してイオン交換体吸着成分を脱離し、回収液5.0を得た。これまでの工程中におけるイオン交換体のベッドボリュームの変化は認められなかった。回収液のラクトフェリン濃度は45mg/100mlであり、280nmにおける吸光度は0.58であった。従って回収液中にラクトフェリンが2250mg得られ、そのラクトフェリンの純度は98.5% ($45 \times 0.0127 \times 100 / 0.58$) であった。

実施例10

生の牛脱脂乳を35℃に加温し、よく攪拌しながら9倍に希釈した塩酸を滴下してpH4.6に調整し、凝集したカードを分離除去して酸ホエーを調整した。得られた酸ホエーはpH4.6でラクトフェリン濃度は25mg/100mlであった。

イオン交換基としてカルボキシメチル基を有し、ヘモグロビン吸着能力が、3.9g/100ml、及び体積変化が3.0であるCM-セファデックスC-50（ファルマシア製）2.5gを水に膨潤して、113mlのNa形のイオン交換体とし、更にこの水に塩酸を加えて0.1N塩酸溶

液とした後、水洗し、H形のイオン交換体を調製した。この時点でのベッドボリュームは73ml、体積変化率は1.5 (113/73) であった。次いで該イオン交換体を、上記酸ホエー10に投入し、4℃で16時間攪拌、接触させバッチ処理した。イオン交換体を取り出しカラムに充填し、水を通じてホエー分を除いた。この時点でのベッドボリュームは39ml、体積変化率は2.9 (113/14) であった。

得られた回収液のラクトフェリン濃度は61mg/100mlであり、280nmにおける吸光度は0.78であった。従って回収液中にラクトフェリンが610mg得られ、そのラクトフェリンの純度は99.3% ($61 \times 0.0127 \times 100 / 0.78$) であった。

実施例11

実施例7において2.5%塩化カリウム溶液20を通じて洗浄し不純物を分離する工程までは、実施例7と同様に実施した。次いで5%塩化ナトリウム10を通液してイオン交換体吸着成分を脱離し、回収液10.0を得た。なお、これらの工程におけるベッドボリューム変化は認められなかった。

回収液のラクトフェリン濃度は65mg/100mlであり、280nmにおける吸光度は0.83であった。従って回収液中にラクトフェリンが6.5g得られ、そのラクトフェリンの純度は99.5% ($65 \times 0.0127 \times 100 / 0.83$) であった。

【発明の効果】

本発明によれば次の効果が得られ、産業上の効果に優れたものである。

(1) 原料乳である脱脂乳、ホエーの品質を何等損なうことなく、その中に含まれているラクトフェリンを、分離回収することができる。

(2) 単純な工程により、高純度のラクトフェリンを得ることができる。

(3) 原料乳を大量に処理することができ、ラクトフェリンの工業的製造に適した製造法を提供することが可能となった。

【図面の簡単な説明】

添付図面は、異なった濃度の塩化ナトリウム溶液を、低濃度から順次、水洗後のイオン交換体に通液し、各流出液を分画して、各流出液の280nmにおける吸光度と、各流出液100ml中のラクトフェリン濃度とを示すグラフである。

10

20

30

40

